

· 论 著 ·

羊水细胞原位培养法在 β -珠蛋白生成障碍性贫血产前诊断中的应用卢秋维¹, 李东明²

(广西壮族自治区: 1. 人民医院检验科; 2. 妇幼保健院优生遗传科, 南宁 5300211)

摘要:目的 探讨羊水细胞原位培养法在 β -珠蛋白生成障碍性贫血产前诊断中的应用价值。方法 对羊水细胞进行原位培养, 应用培养后细胞, 采用聚合酶链反应, 结合反向点杂交技术检测 β -珠蛋白生成障碍性贫血突变类型。结果 426 例羊水细胞均培养成功, 共检出 β -珠蛋白生成障碍性贫血 302 例, 26 种基因型。其中纯合子 30 例, 双重杂合子 71 例, 杂合子 201 例。胎儿合并 α -珠蛋白生成障碍性贫血杂合子 27 例, 其中 Hb Bart's 水肿胎 9 例, HbH 病 1 例。结论 在孕中期行羊膜腔穿刺术获取羊水细胞, 对羊水细胞进行原位培养, 利用培养细胞进行 β -珠蛋白生成障碍性贫血基因诊断, 避免因母体血污染、多次取材导致重型珠蛋白生成障碍性贫血胎儿的误诊或漏诊, 可准确地检出各类 β -珠蛋白生成障碍性贫血基因型。

关键词: 羊水; 细胞培养; β -珠蛋白生成障碍性贫血; 产前诊断

doi: 10. 3969/j. issn. 1671-8348. 2010. 23. 012

中图分类号: R556. 61; R714. 5

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)23-3180-02

Application of amniotic fluid cells in situ cultivation for prenatal diagnosis of β thalassemiaLU Qiu-wei¹, LI Dong-ming²

(1. Department of Clinical Laboratory, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China; 2. Department of Birth Health and Heredity, Women and Child Healthcare Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530003, China)

Abstract: **Objective** To investigate the value of amniotic fluid cells in situ cultivation for prenatal diagnosis of β thalassemia (thal). **Methods** Amniotic fluid cells in situ cultivation were used to detect the β globin genotypes using the polymerase chain reaction followed by reverse dot blot hybridization. **Results** 426 specimens were cultivated successfully. 26 different genotypes were identified in 302 gravidas with β thal. 30 cases were homozygote β thal. 71 cases were double heterozygote β -thal. 201 case were heterozygote β thal. There were 27 fetuses compounded with α -thal. 9 cases of Hb Bart's hydrops fetalis syndrome and 1 case of Hb H disease were included. **Conclusion** Using the amniotic fluid cells in situ cultivation to detect β -globin genotypes, which can detect fetus with homozygote and double heterozygote β -thal accurately, can avoid misdiagnosis or missed diagnosis caused by maternal blood cells.

Key words: amniotic fluid; cell culture; β thalassemia; prenatal diagnosis

β -珠蛋白生成障碍性贫血是广西地区危害最大的血红蛋白病, 目前尚缺少有效的治疗方法, 尤其是重型 β -珠蛋白生成障碍性贫血患儿要靠输血维持生命, 给家庭和社会带来沉重的负担^[1-3]。因此, 对夫妇双方为 β -珠蛋白生成障碍性贫血基因携带的孕妇进行产前诊断, 是防止此类患儿出生的有效措施。但因母体血污染导致重型珠蛋白生成障碍性贫血胎儿的误诊或漏诊时有发生^[4-5], 为此本研究对羊水细胞进行原位培养, 采用培养后细胞进行 β -珠蛋白生成障碍性贫血基因检测, 避免了反复取材, 提高了诊断的准确性, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象 夫妇均为 β -珠蛋白生成障碍性贫血基因携带的妊娠 426 例, 其中曾生育重型 β -珠蛋白生成障碍性贫血患儿者 105 例, 有重型 β -珠蛋白生成障碍性贫血胎儿引产史者 17 例, 接受遗传、产前咨询者 304 例。夫妇双方合并 α -珠蛋白生成障碍性贫血杂合子 37 例。

1.2 标本采集及细胞培养 在孕 13~28 周, B 超引导下羊膜腔穿刺抽取羊水 10~15 mL, 置两支 15 mL 无菌离心管中, 血性羊水加入 EDTA-K2 抗凝。将 1 管羊水离心, 弃上清液, 留下 1 mL 左右; 混匀后吸入装有 3 mL AM-II (美国 GIBCO

公司) 培养基的原位培养瓶中, 置 37 °C、5% 二氧化碳培养箱培养 5~7 d 后, 置倒置显微镜下观察, 当出现 3~5 个细胞克隆后, 换掉培养液, 当出现大量贴壁细胞时, 用生理盐水反复清洗后, 转移到 1.5 mL EP 管内备用。

1.3 珠蛋白生成障碍性贫血基因检测 对培养后细胞采用快速 DNA 提取试剂盒 (深圳益生堂公司) 进行 DNA 提取, 采用单管多重 PCR 体系进行珠蛋白生成障碍性贫血基因扩增, 结合反向点杂交技术检测 17 种 β 和 3 种 α -珠蛋白基因突变类型, 限制性酶切结合琼脂糖凝胶电泳技术检测 3 种 α -珠蛋白基因缺失类型, 按试剂盒说明书进行操作及结果判断。

2 结果

426 例羊水标本, 其中血性羊水 2 例, 离心后肉眼可见血细胞 6 例, 镜下可见血细胞 13 例, 均培养成功, 共检出 β -珠蛋白生成障碍性贫血 302 例, 见表 1。同时检出 Hb Bart's 水肿胎 9 例, 其中复合 β -珠蛋白生成障碍性贫血双重杂合子 4 例; HbH 病 1 例; α -珠蛋白生成障碍性贫血杂合子 17 例, 其中复合 β -珠蛋白生成障碍性贫血纯合子 1 例, 双重杂合子 3 例。21 例母体血污染标本, 检出 β -珠蛋白生成障碍性贫血 16 例, 其中 β -珠蛋白生成障碍性贫血纯合子 1 例; 双重杂合子 5 例, 包括

复合 Hb Bart's 水肿胎 1 例;杂合子 10 例,包括复合 α -珠蛋白生成障碍性贫血杂合子 2 例。另检出 α -珠蛋白生成障碍性贫血杂合子 1 例。终止妊娠 107 例,在本院引产或分娩的胎儿均经验证,结果相符,随访 238 例,无畸形。

表 1 培养后细胞 β -珠蛋白生成障碍性贫血基因诊断结果

基因类型	n	百分比(%)	基因类型	n	百分比(%)
β 纯合子			β 双重杂合子		
41~42/41~42	18	4.23	41~42/71~72	4	0.94
71~72/71~72	1	0.23	41~42/654	3	0.70
17/17	9	2.11	41~42/28	7	1.64
654/654	2	0.47	41~42/17	31	7.28
28/28	1	0.23	41~42/IVS1~1	4	0.94
β 纯合子杂合子			41~42/ β E	3	0.70
71~72/N	9	2.11	71~72/654	2	0.47
41~42/N	108	25.23	71~72/28	1	0.23
17/N	57	13.38	17/ β E	2	0.47
IVS1~1/N	2	0.47	17/654	8	1.88
654/N	14	3.72	17/29	1	0.23
43/N	1	0.23	17/28	3	0.70
28/N	7	1.64	43/28	1	0.23
β E/N	3	0.70	未检出 β 17 种基因突变	124	29.11

3 讨论

β -珠蛋白生成障碍性贫血是 β -珠蛋白基因缺失或突变导致血红蛋白的珠蛋白肽链缺失或合成减少引起的溶血性遗传病。若夫妇双方为同型珠蛋白生成障碍性贫血基因携带者,每次妊娠胎儿有 25% 为重型珠蛋白生成障碍性贫血儿。因此,对高风险人群进行产前基因诊断有着重大意义^[2,6]。目前,进行胎儿基因诊断的取材方法主要有 3 种:经腹腔或宫颈绒毛活检术、羊膜腔穿刺术和经腹脐带穿刺术。前者技术难度较大,1 次取材成功率不高,且可增加胎儿畸形的发生率,易受蜕膜细胞污染造成误诊^[7-8]。羊膜腔穿刺术具有操作简便、并发症少等优点,是临床应用最广泛的取材方法^[9]。脐带穿刺术操作难度较大,诊断时间也较晚,不易发现少量母血污染^[10]。本组 426 例孕妇行羊膜腔穿刺术取羊水,进行珠蛋白生成障碍性贫血产前基因诊断,穿刺成功率为 100%,无严重并发症发生。

羊膜腔穿刺过程中难以避免母体血的污染,而不能检测或再次取样^[11];当标本仅有极少量母体血污染,尤其是肉眼或离心后仍不可见时,易导致误诊^[12]。基于胎儿羊水细胞贴壁生长,而血细胞不贴壁生长的特点,本研究应用细胞原位培养法对羊水细胞进行培养,采用培养后细胞进行珠蛋白生成障碍性贫血产前基因诊断。426 例标本均培养成功,共检出 β -珠蛋白生成障碍性贫血 302 例(70.89%),其中纯合子 31 例,双重杂合子 70 例,与国内外报道相近^[7,13],也与东南亚地区为珠蛋白生成障碍性贫血高发区相一致。同时检出 α -珠蛋白生成障碍性贫血 27 例,其中重型 α -珠蛋白生成障碍性贫血 10 例,包括复合重型 β -珠蛋白生成障碍性贫血 8 例,与陈萍等^[5]报道类似。值得注意的是夫妇双方为 α 复合 β -珠蛋白生成障碍性贫血

血的孕妇中,因重型珠蛋白生成障碍性贫血引产或生育史而行产前诊断者有 17 例,此次诊断为重型珠蛋白生成障碍性贫血者有 5 例,其中 1 例已有 3 次重型珠蛋白生成障碍性贫血孕、育史。为避免该类患儿的出生而再次终止妊娠,建议这类夫妇进行植入前产前诊断^[14-15],这对降低出生缺陷有重要意义。

值得注意的是,本研究 426 例标本中,离心前、后肉眼可见母体血细胞污染标本 8 例,细胞培养时发现 13 例,在显微镜下仍可见一定数量的血细胞;当羊水细胞贴壁后,保留换出的培养液。对检测结果为 β -珠蛋白生成障碍性贫血纯合子和杂合子且与孕妇基因型不同的 5 例,再用换出的培养液提取 DNA 进行检测,仅有 1 例仍为 β -珠蛋白生成障碍性贫血杂合子。考虑可能该标本中的血细胞较少,以及提取过程中的丢失,导致该标本中的母亲基因型未被扩增出来。表明当有母体血污染时,尤其是肉眼不可见或离心后仍不可见的少量母体血污染的标本,一旦被扩增出来,可导致杂合子误诊为 β -珠蛋白生成障碍性贫血双重杂合子或漏诊 β -珠蛋白生成障碍性贫血纯合子^[9]。同样,若夫妇双方为东南亚缺失型 α -珠蛋白生成障碍性贫血携带者,当有母体血污染时,Hb Bart's 水肿胎可误诊为东南亚缺失型^[12]。因细胞培养技术难度较大,故对不具备细胞培养条件的基层医院,应对羊水细胞离心后在显微镜下进行分析,减少母体血污染导致的误诊。

综上所述,为了减少珠蛋白生成障碍性贫血患儿的出生,应加强孕龄人群珠蛋白生成障碍性贫血产前筛查和基因确诊^[16-17]。对夫妇为同型基因携带者,在孕中期行羊膜腔穿刺术获取羊水细胞,对羊水细胞进行原位培养,所需标本量较少,培养成功率高。采用培养后细胞进行珠蛋白生成障碍性贫血基因诊断,可避免母体血污染导致的误诊,提高产前诊断的准确性;同时避免多次取材,减少流产的发生。

参考文献:

- [1] Arthorn R, Issarang N, Kittit, et al. Economic burden of beta-thalassemia/Hb E and beta-thalassemia major in Thai children[J]. BMC Research Notes, 2010, 30(3):29.
- [2] Cao A, Galanello R. Beta-thalassemia[J]. Genet Med, 2010, 12(2):61.
- [3] 蒋利星. β -珠蛋白生成障碍性贫血反复输血产生抗-E 抗体 1 例[J]. 重庆医学, 2009, 38(16):2132.
- [4] 李敏清, 庞丽红, 石凌, 等. 经宫颈绒毛取材用于珠蛋白生成障碍性贫血产前诊断 883 例分析[J]. 实用妇产科杂志, 2008, 24(3):160.
- [5] 陈萍, 龙桂芳, 李树全, 等. 771 例 α -珠蛋白生成障碍性贫血产前基因诊断[J]. 广西医科大学学报, 2004, 21(5):3.
- [6] Li CG, Li CF, Li Q, et al. Thalassemia incidence and treatment in China with special reference to Shenzhen City and Guangdong province[J]. Hemoglobin, 2009, 33(5):296.
- [7] Suhaib A. Prenatal diagnosis of β -thalassemia: 12 years' experience at a single laboratory in Pakistan[J]. Prenatal Diagnosis, 2007, 27(13):1224.
- [8] Wolstenhoime J, Emslie JB, Connors S. Association of clinical cytogeneticists chorion villus sampling database 1987-2000[J]. Prenat Diagn, 2006, 26(5):420.
- [9] Hossein N, Alireza G, Farhad S, et al. (下转第 3184 页)

水平($P < 0.01$),似乎证实了镇痛不足与免疫功能抑制的相关性密切。然而以上观察指标在应用阿片类镇痛药的 C 组与 E 组中比较却未见显著差异,而应用外周神经阻滞机制(切口持续局部麻醉、硬膜外镇痛)的 B 组、C 组、D 组在术后 24、48 h 与使用静脉镇痛的 E 组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),特别是行 PCEA 的 D 组与行 PCIA 的 E 组在术后 48 h 相对免疫的抑制显著减轻($P < 0.01$)。这似乎不能单纯用阿片类镇痛药对免疫的影响进行解释。

IL-1 β 、TNF- α 是重要的促炎性细胞因子,可间接反映创伤后机体应激和免疫功能的变化情况。本研究中,各组 TNF- α 、IL-1 β 的变化与 CD4 $^{+}$ 、CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ 、NK 细胞的变化趋势相吻合。特别是在术后 24、48 h 时,D 组明显低于 E 组($P < 0.01$),结合 CD4 $^{+}$ 、CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ 、NK 细胞的变化情况,证实了有效地镇痛不一定能有效地降低术后的应激和改善术后的免疫功能抑制。似乎可以提示在肺癌患者术后,不同的镇痛模式对患者的免疫功能影响可能有差异,通过外周神经机制作用的镇痛方式对于机体的应激功能和免疫功能可能更具有保护作用^[9]。然而,单纯阻滞切口镇痛(B 组)与行 PCIA(E 组)相比,在 VAS 评分和对免疫功能的影响各方面并无太大差异,这是否说明行 PCEA(D 组)阻断了胸腔的诸多有害刺激传入中枢才是保护免疫功能的外周机制的关键所在呢?此外,本研究结果显示,各组 VAS 评分和免疫保护作用并不呈现出同向或反向的相关变化关系,是否可能提示适度的镇痛才真正有益于机体的免疫保护?目前对于疼痛的评定标准尚不完善,影响了对结果的分析,这些均有待进一步深入研究。

综上所述,肺癌患者术后受各种因素限制,疼痛治疗采用的治疗药物和方法不尽一致,多模式镇痛已经成为发展趋势^[9]。肺癌患者术后有效镇痛可改善免疫抑制,不同的镇痛模式对免疫功能的影响有差异,寻求较适宜的组合方案可以提高围术期安全性和改善预后,通过外周神经机制镇痛的模式在保护免疫方面可能更具有优势,但其中许多环节尚待进一步的研究证实。

参考文献:

- [1] 肖建刚.全麻复合硬膜外麻醉应用于大型胸腹部手术的麻醉效果观察[J].海南医学,2009,20(7):31.
- [2] Page GG. Surgery-induced immunosuppression and postoperative Pain management[J]. A CAN Clin Issues, 2005, 16(2):302.
- [3] Valien JL, Hernando AN, Gascon AH, et al. Cellular immune response to 3 anesthetic techniques for simple abdominal hysterectomy[J]. Rev Esp Anesthesiol Reanim, 2007,54(9):523.
- [4] 杨联云,赵世巧.肿瘤免疫治疗的研究进展[J].检验医学与临床,2007,4(5):392.
- [5] Liu Z, Gao F, Tian Y. Effects of morphine, fentanyl and tramadol on human immune response [J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci[J]. 2006,26(4):478.
- [6] 秦俊,易斌.芬太尼自控镇痛对食管癌根治术后 T 细胞、NK 细胞的影响[J].重庆医学,2008,37(4):416.
- [7] Yokoyama M, Itano Y, Katayama H, et al. The effects of continuous epidural anesthesia and analgesia on stress response and immune function in patients undergoing radical esophagectomy [J]. Anesth Analg, 2005, 101(5):1521.
- [8] 秦俊,邓清华,罗培海.食道癌根治术后 PCIA 影响免疫功能状态的临床研究[J].重庆医学,2006,35(23):2169.
- [9] Xing CY, Wu MY, Fan HP. Effects of different anesthetic and analgesic protocols on cellular immune function and stress hormone level in patients undergoing lobectomy for esophagus cancer[J]. Nanfang Yikedaxue Xuebao, 2010, 30(2):284.

(收稿日期:2010-06-06 修回日期:2010-07-02)

(上接第 3181 页)

Fourteen-Year experience of prenatal diagnosis of thalassaemia in Iran[J]. Community Genet, 2006,9(1):93.

- [10] Liao C, Mo QH, Li J, et al. Carrier screening for alpha and beta-thalassemia in pregnancy: The results of an 11-year prospective program in Guangzhou Maternal and Neonatal hospital[J]. Prenat Diagn, 2005,25(2):163.
- [11] 陈剑虹,林静吟.羊膜腔穿刺术在产前诊断珠蛋白生成障碍性贫血中的应用[J].国际医药卫生导报,2009,15(13):44.
- [12] 黄莹,李东明.改良羊水原位培养技术在产前诊断中的应用[J].广西医学,2008,30(12):1852.
- [13] 李坚,李冬至,廖灿,等.应用反向点杂交法产前诊断 β -珠蛋白生成障碍性贫血 375 例[J].中国优生与遗传杂志,

2007,15(7):11.

- [14] Gibbons CA, Allanson J, Blaine SM, et al. Genetics: Preimplantation genetic diagnosis [J]. Can Fam Physician, 2010,56(3):247.
- [15] Xu YW, Zeng YH, Deng J, et al. Preimplantation genetic diagnosis for alpha-thalassaemia in China[J]. J Assist Reprod Genet, 2009,26(7):399.
- [16] 李军,殷和.珠蛋白生成障碍性贫血的诊断技术及进展[J].重庆医学,2009,38(7):864.
- [17] 吕福通,谢丹尼,陈一君,等.广西区计划生育服务网络开展珠蛋白生成障碍性贫血干预经验[J].中国计划生育学杂志,2009,19(4):241.

(收稿日期:2010-06-25 修回日期:2010-08-17)